低温处理对亚洲玉米螟幼虫抗寒性的诱导效应

冯从经[1]，吕文静[1]，董秋安[1]，陈　俊[1]，符文俊[2]

(1. 扬州大学园艺与植物保护学院植物保护系,江苏扬州　225009；
2. 中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所,上海　200032)

摘要：室内条件下将亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée)幼虫放置在 5℃(LT1 处理组)和 0℃(LT2 处理组)下低温处理 2 h 后,分别测定了其低温诱导识别温度、存活率、抗寒性、过冷却点、体内水分和脂质含量百分率,并进行抗冻特异蛋白的诱导；利用 SDS-PAGE 方法分析了低温诱导后亚洲玉米螟 5 龄幼虫血清中抗冻特异蛋白。结果表明：亚洲玉米螟 3、4 和 5 龄幼虫的低温诱导识别温度分别为 -13.5℃、-16.5℃和 -18.5℃；3、4 和 5 龄幼虫存活率 LT2 组 > LT1 组 > 对照组($P < 0.05$)；随虫龄增加,幼虫抗寒性逐步增强；对幼虫过冷却点无明显影响($P > 0.05$)；幼虫水分和脂质含量百分率为 LT2 组 > LT1 组 > 对照组,且随虫龄增加,虫体含水率和脂质含量百分率增高($P < 0.05$)；低温诱导产生了一种分子量约为29.0 kD的抗冻特异蛋白。研究结果表明低温诱导可以增强亚洲玉米螟幼虫的抗寒性。

关键词：亚洲玉米螟；抗寒性；过冷却点；抗冻特异蛋白

中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2007)01-0001-06

Effect of low temperature treatment on larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae)

FENG Cong-Jing[1], LU Wen-Jing[1], DONG Qiu-An[1], CHEN Jun[1], FU Wen-Jun[2] (1. Department of Plant Protection, School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; 2. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: The larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée), were treated for 2 h in the laboratory under the temperature 5℃ (LT1) and 0℃ (LT2), respectively. The discriminating temperature, survival rate, cold tolerance, super-cooling point, and the rates of water and lipid in the Asian corn borer larvae after low temperature treatment were determined, respectively. The special antifreeze protein in the serum of the 5th instar larvae of *O. furnacalis* after low temperature treatment was analyzed with SDS-PAGE. The results showed that the discriminating temperatures for the 3rd, 4th and 5th instar larvae were -13.5℃, -16.5℃ and -18.5℃, respectively. The survival rates of 3rd, 4th and 5th instar larvae all showed the tendency of LT2 > LT1 > the control group after low temperature treatment ($P < 0.05$). With the increase of instar, the cold tolerance of the larvae increased gradually, and the rates of water and lipid in the larvae also increased significantly ($P < 0.05$). The super-cooling point of the larvae was not effected significantly by low temperature ($P > 0.05$). The rates of water and lipid in larval body showed the tendency of LT2 > LT1 > the control group after low temperature treatment. A special antifreeze protein with the molecular weight about 29.0 kD was detected in the 5th instar larvae. It was so concluded that low temperature treatment could increase the cold tolerance in the Asian corn borer larvae.

Key words: *Ostrinia furnacalis*; cold tolerance; super-cooling point; antifreeze special protein

自然界低温条件对昆虫造成的损伤有两种,一种是结冰损伤,另一种是非结冰损伤。通常,大多数昆虫易死于体内可形成冰晶的结冰损伤。当昆虫长期或突然暴露在体内结冰温度以上时,也会被冷休

基金项目：国家自然科学基金项目(30571248)

作者简介：冯从经,男,1974 年 10 月生,博士,副教授,从事昆虫生理生化研究,E-mail：fengcj@yzu.edu.cn

收稿日期 Received：2006-05-17；接受日期 Accepted：2006-08-17

克或直接冷伤害造成的非结冰损伤致死。低温适应以后，昆虫在行为或生理状态上会发生一系列变化，如进入休眠或滞育状态、体内多元醇等抗冻小分子物质含量增加、抗冻蛋白（antifreeze protein）和冰核出现等，以增强其抵抗低温伤害能力，这一过程可能是昆虫应对不良环境适应性的进化现象（Lee，1991）。根据在低温条件下驯化时间的长短，冷驯化可分为二种类型：一种是长时间冷驯化，即昆虫通过几天甚至几周的低温锻炼，从而获得抗低温能力，这种驯化主要应对间接冷伤害和结冰伤害；另一种是短时间冷驯化，也称快速冷驯化（rapid cold hardening），是在几个小时甚至几十分钟内发生的冷驯化过程，主要应对直接冷伤害或冷休克。相对于长期研究的越冬冷驯化反应来说，快速冷驯化现象是近期才发现的。在早春或晚秋气温急剧波动的情况下，许多昆虫可以通过快速冷驯化反应迅速提高它们的耐寒能力，抵御自然界昼夜温度的急剧变化或短时间的低温暴露。昆虫快速冷驯化相关的生理调节对于其种群的生存和繁衍至关重要（王宪辉等，2003）。

经过多年的研究，在麻蝇 *Sarcophaga crassipalpis*（Chen *et al*.，1987）、一种叶甲 *Xanthogaleruca luteola*、一种食草昆虫 *Oncopeltus fasciatus*（Lee *et al*.，1987）、*Blaesophixa luteola*（Chen *et al*.，1990）、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（Czajka and Lee，1990）、家蝇 *Musca domestica*（Coulson and Bale，1990）和大斑蝶 *Danaus plexippus*（Laesen and Lee，1994）等诸多昆虫中都发现了快速冷驯化现象。迄今，已在双翅目、鞘翅目、鳞翅目、缨翅目、半翅目、同翅目、直翅目及其他节肢动物中发现了这种冷驯化。国内外学者对昆虫低温诱导效应研究多集中在昆虫生活史越冬期的季节适应能力方面，对诱导条件、驯化效应、不良代价和生态适应意义等方面进行了一些研究，对昆虫低温适应机理的研究则相对较少。我们对北方重要害虫亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*（Guenée）幼虫低温诱导的识别温度、抗寒性与过冷却点（supercooling point）的关系、虫体水分和脂质含量对抗寒性的影响进行了研究，并通过低温诱导产生了抗冻特异蛋白，为进一步阐明昆虫低温诱导效应的生理机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 识别温度测定

参照 McDonald 等（1997）方法，将在正常饲养条件（25℃ ± 1℃，16L∶8D）下以人工饲料饲养的 3、4 和 5 龄亚洲玉米螟幼虫每组 30 头分别转移到 − 8.5℃ ~ − 20℃下 2 h，再转移到正常饲养条件下饲养 24 h 后计算幼虫存活率（以能协调运动作为活虫标准），存活率约为 20%时的温度即为识别温度。实验设 3 个重复。

1.2 低温诱导和检测

参照 McDonald 等（1997）方法，将亚洲玉米螟 3、4 和 5 龄幼虫各分成 3 组，每组 30 头幼虫，按以下方法处理：（1）CK（对照组）：从正常饲养条件下将幼虫以 0.5℃/min 的速率分别下降到各龄幼虫的识别温度，在识别温度下放置 2 h；（2）LT1：将幼虫从正常饲养条件下直接转移到 5℃下放置 2 h，再分别转移到各自识别温度下处理 2 h；（3）LT2：将幼虫从正常饲养条件下转移到 0℃下放置 2 h，再分别转移到相应识别温度下处理 2 h。处理结束后幼虫转移到正常饲养条件下饲养，分别在 2 h 和 24 h 后计算幼虫存活率和幼虫正常化蛹后羽化率。实验设 3 个重复。

1.3 抗寒性测定

参照 Kostal 和 Simek（2000）方法将供试幼虫每组 30 头分别放置在预设温度的冰箱和光照培养箱中，在恒定温度 − 20℃、− 15℃、− 10℃、− 5℃、0℃、5℃、10℃、15℃和 20℃（误差为 ± 0.5℃）下分别放置 48 h，低温处理后转移到正常饲养条件下饲养，24 h 后计算存活率。实验设 3 个重复。

1.4 过冷却点测定

参照 Dautel 和 Knulla（1997）方法改进，将热电耦传感器探头固定在单个虫体上，将昆虫置于塑料管内，放入冷柜中，从室温开始以非线性的速率 0.5℃/min 降温，经数据采集系统（江苏森意发展有限公司提供）收集数据后输入计算机，采用相应软件进行数据记录、绘图和分析，确定 CK、LT1 和 LT2 处理组的过冷却点。实验设 3 个重复。

1.5 含水率测定

参照 Kostal 等（1998）方法将 CK、LT1 和 LT2 3 个处理组的亚洲玉米螟 3、4 和 5 龄幼虫单头置于电子天平上称重，测定湿重（wet weight，*WW*），然后将虫体放在 60℃下干燥 48 h，称得干重（dry weight，*DW*），计算个体含水率：$[(WW - DW)/WW] \times 100$。实验设 3 个重复。

1.6 脂质含量百分率测定

参照 Kostal 等（1998）方法将测定了干重（*DW*）的 CK、LT1 和 LT2 三个处理组亚洲玉米螟 3、4 和 5

龄幼虫个体匀浆，用氯仿∶甲醇 = 2∶1 的溶液抽提，然后 2 600 × g 离心 10 min，移去上清液重复抽提 2 次后，将沉淀物在 60℃ 下干燥 72 h，测定其干重（lean dry weight，*LDW*），计算含脂质百分率：[（*DW* – *LDW*）/*DW*] × 100。实验设 3 个重复。

1.7　蛋白质浓度测定

采用 Bradford（1976）法测定蛋白浓度。

1.8　抗冻特异蛋白诱导及 SDS-PAGE 分析

收集正常饲养以及经过 1 次和 2 次 0℃低温处理 2 h 的亚洲玉米螟 5 龄幼虫血淋巴，800 × g 离心 10 min 去除血细胞，取上清液制备样品。采用非变性不连续 SDS-PAGE（15%分离胶，4%浓缩胶）30 mA 稳流电泳，考马斯亮蓝 G-250 染色。

1.9　数据处理

采用 SPSS 11.5 软件对实验数据进行 *t*-测验及方差分析。

2　结果与分析

2.1　识别温度测定结果

将 3、4 和 5 龄亚洲玉米螟幼虫分别放置在 –8.5℃至 –20℃下冷休克处理 2 h，再转移到正常温度下饲养 24 h 后，其存活率测定结果（图 1）表明：经冷休克处理后 3 龄、4 龄和 5 龄幼虫存活率都明显下降，其中 3 龄幼虫经 –10℃和 –13.5℃处理后的存活率分别约 88%和 20%；4 龄幼虫在 –10℃和 –16.5℃处理后的存活率约 89%和 20%；5 龄幼虫在 –10℃和 –18.5℃处理后的存活率约 90.4%和 20%，故亚洲玉米螟 3、4 和 5 龄幼虫的冷诱导识别温度分别为 –13.5℃、–16.5℃和 –18.5℃。

2.2　低温诱导和检测

将亚洲玉米螟 3、4 和 5 龄幼虫分别移到 5℃和 0℃下放置 2 h，再转移到相应识别温度下处理 2 h，然后移至正常饲养条件下，2 h 和 24 h 后幼虫存活率和幼虫正常化蛹后羽化率的测定结果（表 1）表明：3、4 和 5 龄幼虫存活率 LT2 组 > LT1 组 > CK 组（$P < 0.05$）。以 5 龄幼虫为例，LT2 组幼虫存活率大于 LT1 组，说明 0℃低温诱导比 5℃低温诱导幼虫产生更强的抗寒性。从表 1 还可看出低温诱导后不同虫龄幼虫的存活率 5 龄 > 4 龄 > 3 龄，说明随龄期增加低温诱导的抗寒性增强。经低温诱导处理后存活幼虫化蛹后的羽化率 5 龄 > 4 龄 > 3 龄，说明低温诱导对 3 龄幼虫的生长发育产生的影响最大。

2.3　抗寒性测定结果

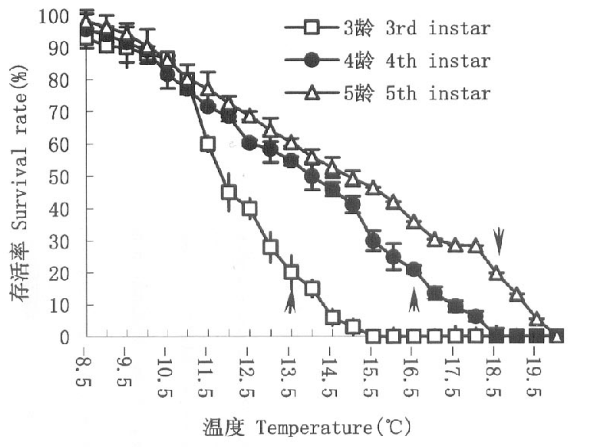

图 1　亚洲玉米螟幼虫低温诱导识别温度的测定

Fig. 1　Determination of the discriminating temperatures in the larvae of *Ostrinia furnacalis*

正常饲养条件下的 3、4 和 5 龄幼虫分别转移到 –8.5℃ ~ –20℃下 2 h，再转移到正常饲养条件下，24 h 后计算死亡率。3 个箭头指示 3、4 和 5 龄幼虫的识别温度分别为 –13.5℃、–16.5℃和 –18.5℃。The 3rd，4th，and 5th instar larvae were transferred from normal condition to the low temperature of –8.5℃ to –20℃ for 2 h，then larvae were returned to normal condition，and the rate of death was calculated after 24 h. Three arrowheads indicate that the discriminating temperatures for the 3rd，4th and 5th instar larvae are –13.5℃，–16.5℃ and –18.5℃，respectively.

表 1　亚洲玉米螟幼虫低温诱导后的存活率与羽化率

Table 1　Larval survival rate and the eclosion rate of *Ostrinia furnacalis* after low temperature treatment（mean ± *SD*）

处理 Treatment	幼虫存活率 Larval survival rate（%） 2 h	24 h	羽化率（%） Eclosion rate
3 龄 3rd instar			
CK	43.1 ± 1.5 a	20.5 ± 1.3 a	1.7 ± 1.3 a
LT1	50.5 ± 2.1 b	27.0 ± 2.3 b	3.9 ± 1.6 b
LT2	53.0 ± 1.6 c	33.2 ± 1.3 c	5.5 ± 0.8 c
4 龄 4th instar			
CK	46.6 ± 2.4 a	20.3 ± 3.4 a	5.5 ± 0.9 a
LT1	54.0 ± 3.1 b	28.6 ± 1.4 b	6.7 ± 1.0 b
LT2	61.3 ± 4.3 c	36.0 ± 3.1 c	8.2 ± 1.3 c
5 龄 5th instar			
CK	47.5 ± 1.3 a	29.5 ± 4.3 a	7.8 ± 0.2 a
LT1	58.0 ± 5.1 b	36.0 ± 2.3 b	10.0 ± 0.4 b
LT2	67.5 ± 2.3 c	47.8 ± 1.9 c	18.2 ± 0.5 c

注：CK 表示将幼虫以 0.5℃/min 的速率分别下降到各龄幼虫的识别温度后放置 2 h，LT1 和 LT2 分别表示将幼虫在 5℃和 0℃下放置 2 h 低温诱导后再分别转移到各自识别温度下处理 2 h；同列数据后不同小写字母代表组间差异显著（$P < 0.05$），下同。

Notes：CK refers to the *O. furnacalis* larvae group treated with low temperature with the decrease rate about 0.5℃/min until the discriminating temperatures of their respective instar，in which they were kept for 2 h. LT1 and LT2 refer to the larvae of *O. furnacalis* treated under 5℃ and 0℃ for 2 h，respectively，and then kept under the discriminating temperatures of their respective instar for 2 h. Data with different small letters in same column are significantly different at $P < 0.05$. The same below.

采用 – 20℃至 20℃的温度处理 3、4 和 5 龄亚洲玉米螟幼虫 48 h 后，幼虫的存活率 5 龄 > 4 龄 > 3 龄，随处理温度降低到零度以下，幼虫存活率明显下降，说明随虫龄增加，幼虫抗寒性逐步增强(图 2)。

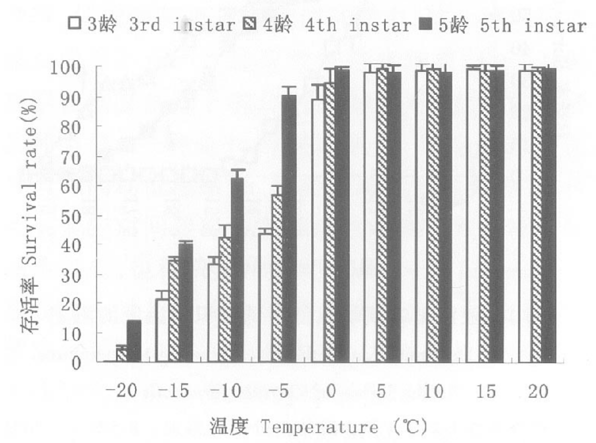

图 2 亚洲玉米螟幼虫抗寒性的测定

Fig. 2 Cold tolerance determination in the larvae of *Ostrinia furnacalis*

幼虫分别放置在 – 20℃ ~ 20℃下处理 48 h，经低温处理后转移到正常饲养条件下，24 h 后计算死亡率。The larvae were treated under the constant temperatures between – 20℃ and 20℃ for 48 h, respectively, and then returned to normal condition with the rate of death calculated after 24 h.

2.4 过冷却点测定结果

测定结果(表 2)表明：随虫龄增加过冷却点明显降低；经 5℃和 0℃低温诱导处理对 3、4 和 5 龄幼虫的过冷却点未产生明显影响($P > 0.05$)，说明低温诱导并不能诱导亚洲玉米螟幼虫过冷却点的降低，幼虫抗寒能力的大小并不完全取决于过冷却点的高低。

表 2 亚洲玉米螟幼虫低温诱导后的过冷却点

Table 2 Super-cooling point in the larvae of *Ostrinia furnacalis* after low temperature treatment (mean ± *SD*)

处理 Treatment	过冷却点 Super-cooling point (℃) 3 龄 3rd instar	4 龄 4th instar	5 龄 5th instar
CK	– 14.2 ± 2.1 a	– 17.3 ± 3.2 a	– 20.6 ± 1.3 a
LT1	– 14.6 ± 2.6 a	– 17.5 ± 3.7 a	– 20.3 ± 3.4 a
LT2	– 14.5 ± 2.3 a	– 17.2 ± 3.4 a	– 20.5 ± 1.3 a

2.5 含水率和脂质含量百分率的测定结果

测定结果(表 3)表明：3、4 和 5 龄亚洲玉米螟幼虫含水率 LT2 组 > LT1 组 > CK 组，随虫龄增加，虫体含水率增高，说明低温诱导有利于提高幼虫的保水率；从表 1、表 3 和图 2 可知幼虫含水率越高，低温诱导幼虫存活率越高，抗寒性越强。经低温诱导亚洲玉米螟 3、4 和 5 龄幼虫干重中脂质含量百分率 LT2 组 > LT1 组 > CK 组，随虫龄增加，脂质含量百分率增高($P < 0.05$)(表 3)，说明低温可以诱导虫体合成更多脂肪，以提高虫体的抗寒性。

2.6 抗冻特异蛋白的诱导与检测

对经 1 次和 2 次 0℃低温诱导的亚洲玉米螟 5 龄幼虫的血清采用 SDS-PAGE 分析，结果表明：0℃低温诱导 5 龄幼虫产生一种相对分子量约为 29.0 kD的抗冻特异蛋白，而在正常饲养的 CK 组幼虫血清电泳图谱中无此条带(图 3)。

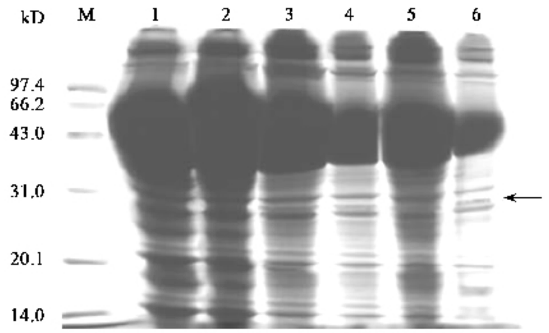

图 3 低温诱导后亚洲玉米螟 5 龄幼虫血清中抗冻特异蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the special antifreeze protein in the serum of the 5th instar larvae of *Ostrinia furnacalis* after low temperature treatment

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1，2：正常幼虫血清 Serum of normal larvae (40 μg)；3：0℃低温诱导 1 次的幼虫血清 Serum of larvae after one low temperature treatment under 0℃ (20 μg)；4：0℃低温诱导 1 次的幼虫血清 Serum of larvae after one low temperature treatment under 0℃ (10 μg)；5：0℃低温诱导 2 次的幼虫血清 Serum of larvae after two low temperature treatments under 0℃ (20 μg)；6：0℃低温诱导 2 次的幼虫血清 Serum of larvae after two low temperature treatments under 0℃ (10 μg).

表 3 低温诱导后亚洲玉米螟幼虫水分和脂质含量百分率

Table 3 Rates of water and lipid in the larvae of *Ostrinia furnacalis* after low temperature treatment (mean ± *SD*)

处理 Treatment	含水率 Rate of water (%) 3 龄 3rd instar	4 龄 4th instar	5 龄 5th instar	脂质含量百分率 Rate of lipid (%) 3 龄 3rd instar	4 龄 4th instar	5 龄 5th instar
CK	50.3 ± 1.3 a	54.0 ± 3.6 a	60.5 ± 5.2 a	42.7 ± 3.6 a	50.6 ± 5.3 a	53.2 ± 4.3 a
LT1	57.1 ± 4.1 b	65.7 ± 3.5 b	68.4 ± 4.3 b	46.2 ± 3.9 b	53.3 ± 1.3 b	57.6 ± 1.6 b
LT2	62.5 ± 5.3 c	67.9 ± 1.3 c	72.6 ± 6.2 c	50.3 ± 4.3 c	57.2 ± 6.2 c	60.1 ± 1.6 c

3　讨论

3.1　低温诱导与昆虫抗寒性的关系

McDonald 等（1997）将西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 1 龄若虫在 5℃或 0℃下快速冷驯化 4 h 后，再放置在识别温度下饲养，其存活率可达到 90%。Kelty 和 Lee（1999）也发现黑腹果蝇在经过快速冷驯化后比经正常自然降温有更高的存活率。本实验结果表明，亚洲玉米螟 3、4 和 5 龄幼虫的 LT1 组和 LT2 组存活率都明显高于对照组，低温可诱导亚洲玉米螟产生较强的抗寒性。Yi 和 Lee（2004）也认为通过快速冷驯化可增强昆虫抗寒性，使致死温度降低 -3℃，如识别温度下的识别时间延长，将使经历短期低温暴露的昆虫受益，但长期遭受室外严寒条件的昆虫种群不会得以维持。

本实验对亚洲玉米螟幼虫抗寒性测定结果表明：采用过冷却点以上低温处理该虫时存活率较高，-10℃时 3 龄幼虫存活率为 33.6%，4 龄和 5 龄幼虫存活率分别为 42.3%和 62.3%，说明亚洲玉米螟幼虫为非抗冻敏感型；本实验中低温诱导后幼虫存活率 5 龄 > 4 龄 > 3 龄，说明亚洲玉米螟不同虫龄的低温诱导的敏感性不相同，这可能与不同虫龄的生理代谢水平有关，也可能与诱导时使用的降温速率有关。Yi 和 Lee（2004）从麻蝇组织中分离细胞，经快速冷驯化（0℃，2 h；-8℃，2 h保存），在体内、体外条件下对离体和活体细胞采用荧光探针指示，发现经过快速冷驯化处理的种群比冷休克（-8℃，2 h）种群体内、体外对离体和活体细胞有较高的存活率，表明昆虫细胞在没有神经分泌活动参与的情况下也可对冷驯化作出反应，说明在细胞水平上也存在快速冷驯化。不同昆虫、不同虫态快速冷驯化识别温度存在差异。本实验中亚洲玉米螟 3、4 和 5 龄幼虫的低温诱导识别温度分别为 -13.5℃、-16.5℃和 -18.5℃。McDonald 等（1997）将西花蓟马 1 龄若虫放置在 -5℃至 -15℃下 2 h 后测定了存活率，-11.5℃时存活率为 20%，故西花蓟马快速冷驯化的识别温度为 -11.5℃。

3.2　昆虫过冷却点与抗寒性关系

低温条件下昆虫一般能够降低体液的结冰点，昆虫具有的这种过冷却能力在抗寒性中起着重要作用。通常低温条件下幼虫的过冷却点在个体间变化较大，但对群体来说过冷却点有严格的季节相关性，在较温暖的季节如不考虑昆虫的生理状态，过冷却点相对较高，接近冬天过冷却点则较低。本实验结果表明低温诱导对亚洲玉米螟幼虫过冷却点无明显影响。过冷却点是否降低与虫种有关，也可能与地区或化性有关，同种昆虫越冬地点不同过冷却点也可能不同。鲁新等（1997）发现亚洲玉米螟一化性越冬代的过冷却点比二化性越冬代低 4℃左右，相同化性的不同地理种群之间略有差异，过冷却点与低温诱导是否有遗传特性尚需研究。

3.3　昆虫体内水分、脂质和其他小分子物质含量与抗寒性的关系

昆虫低温诱导抗寒性增强包含了一系列复杂的生理生化过程，诸如体内小分子冷冻保护剂甘油、海藻糖等和水分含量的变化、胞外液体中阻止冰晶形成的冰核剂的诱导、抗冻蛋白和相关酶类的产生以及对细胞膜脂进行的修饰等（Lee，1991）。另外，冷冻时水离开细胞而甘油进入细胞，细胞膜对水和甘油的运输对于脂肪体细胞能否在低温时避免冷伤害至关重要。Lee 等（2006）采用 P^{31} 标记的核磁共振波谱法（NMR）测定了麻蝇脂肪体细胞膜的流通性，认为快速冷驯化可提高细胞膜的流通性，通过快速修饰细胞膜来提高细胞抵抗冷伤害的耐受性。本实验结果表明：亚洲玉米螟幼虫不同龄期含水率越高，抗寒性越强，低温可以诱导虫体合成更多脂肪，提高虫体的抗寒性，同时可以诱导产生一种分子量约 29.0 kD 的抗冻特异蛋白的合成。Kostal 等（2004）发现在 *Pyrrhocoris apterus* 成虫虫体血淋巴中水分含量越高，快速冷驯化处理后水分损失越少，表现出的抗寒性越高。Yi 和 Lee（2004）发现黑腹果蝇经 -4℃、-6℃、-8℃冷休克诱导没有热休克蛋白（heat shock protein，HSP）Hsp70 产生，但 5 h 快速冷驯化能显著诱导细胞膜中磷脂脂肪酸（phospholipids fatty acids，PLFAs）的变化，其中十四碳饱和脂肪酸和十六碳一烯酸不饱和脂肪酸含量增加而十八碳饱和脂肪酸和十八碳一烯酸不饱和脂肪酸含量减少，这些改变可以增强快速冷驯化期间黑腹果蝇的抗冻能力。Chen 等（1987）发现麻蝇快速冷驯化处理后甘油含量稍有增加。黑腹果蝇经过缓慢降温或自然温周期后，体内的小分子抗冻物质如甘油、海藻糖、果糖等的含量没有变化，也没有热休克蛋白的诱导，但脯氨酸含量增加（Misener *et al*.，2001）。

本实验中低温诱导产生了相对分子量为 29.0 kD的抗冻特异蛋白，尚有待采用多克隆抗体进行免疫印迹分析，以明确该蛋白是抗冻蛋白还是冷休克诱导产生的热休克蛋白。对低温诱导后昆虫体

内甘油、糖类和各种氨基酸的含量、抗冻特异蛋白的组织特异性、细胞膜脂成分的变化、冷休克反应引起神经肌肉的伤害等生理机制尚需进一步研究。

参 考 文 献（References）

Bradford MM，1976．A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding．*Analyt*．*Biochem*．，72：248－254．

Chen CP，Denlinger DL，Lee RE，1987．Cold-shock injury and rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*．*Physiological Zoology*，60：297－304．

Chen CP，Lee RE，Denlinger DL，1990．A comparison of the responses of tropical and temperate flies（Diptera：Sacrophagidae）to cold and heat stress．*Journal of Comparative Physiology B*，160：543－547．

Coulson SJ，Bale JS，1990．Characterization of the rapid cold hardening response in the house fly *Musca domestica*（Diptera：Muscidae）．*Journal of Insect Physiology*，36：207－211．

Czajka MC，Lee RE，1990．A rapid cold-hardening response protecting against cold shock injury in *Drosophila melanogaster*．*Journal of Experimental Biology*，148：245－254．

Dautel H，Knulle W，1997．Cold hardiness，supercooling ability and causes of low-temperature mortality in the soft tick，*Argas reflexus*，and the hard tick，*Ixodes ricinus*（Acari：Ixodoidea）from central Europe．*Journal of Insect Physiology*，43(9)：843－854．

Kelty JD，Lee RE，1999．Induction of rapid cold hardening by cooling at ecologically relevant rates in *Drosophila melanogaster*．*Journal of Insect Physiology*，45：719－726．

Kostal V，Simek P，2000．Overwintering strategy in *Pyrrhocoris apterus*（Heteroptera）：the relations between life-cycle，chill tolerance and physiological adjustments．*Journal of Insect Physiology*，46：1 321－1 329．

Kostal V，Sula J，Simek P，1998．Physiology of drought tolerance and cold hardiness of the Mediterranean tiger moth *Cymbalophora pudica* during summer diapause．*Journal of Insect Physiology*，44(2)：165－173．

Kostal V，Vambera J，Bastl J，2004．On the nature of pre-freeze mortality in insects：water balance，ion homeostasis and energy charge in the adults of *Pyrrhocoris apterus*．*Journal of Experimental Biology*，207：1 509－1 521．

Laesen KJ，Lee RE，1994．Cold tolerance including rapid cold hardening and inoculative freezing of fall migrant monarch butterflies in Ohio．*Journal of Insect Physiology*，40：859－864．

Lee RE，1991．Principles of insect low temperature tolerance．In：Lee RE，Denlinger DL eds．Insects at Low Temperature．New York：Chapman and Hall．17－46．

Lee RE，Chen CP，Denlinger DL，1987．A rapid cold hardening progress in insect．*Science*，238：1 415－1 417．

Lee RE，Damodaran K，Yi SX，Lorigan GA，2006．Rapid cold-hardening increases membrane fluidity and cold tolerance of insect cells．*Cryobiology*，52(3)：459－463．

Lu X，Zhou DR，Li JP，1997．The relation between voltinism of Asian corn borer，*Ostrinia furnacalis* Guenée and freeze-resistance ability．*Maize Science*，5(4)：72－77．[鲁新，周大荣，李建平，1997．亚洲玉米螟化性与抗寒能力的关系．玉米科学，5(4)：72－77]

McDonald JR，Bale JS，Walters KFA，1997．Rapid cold hardening in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*．*Journal of Insect Physiology*，8：759－766．

Misener SR，Chen C，Walker VK，2001．Cold tolerance and proline metabolic gene expression in *Drosophila melanogaster*．*Journal of Insect Physiology*，47(4－5)：393－400．

Wang XH，Qi XL，Kang L，2003．Rapid cold hardening in insect and its ecological adaption．*Progress in Natural Science*，13(11)：1 128－1 133．[王宪辉，齐宪磊，康乐，2003．昆虫快速冷驯化现象及其生态适应意义．自然科学进展，13(11)：1 128－1 133]

Yi SX，Lee RE，2004．*In vivo* and *in vitro* rapid cold-hardening protects cells from cold-chock injury in the flesh fly．*Journal of Comparative Physiology B*，174(8)：611－615．

（责任编辑：黄玲巧）